

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14928

研究課題名(和文) 食品成分による膜マイクロドメインの構成・構造変化と脂肪蓄積コントロール

研究課題名(英文) Constitutive and structural changes of membrane microdomains and lipid accumulation control by food chemicals

研究代表者

中村 宜督 (NAKAMURA, Yoshimasa)

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：60324381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：膜マイクロドメインを構成する要素の組成変化やインスリンシグナル伝達の修飾を誘導する食品成分を同定し、その機能を明らかにした。具体的には、インスリンシグナル伝達を修飾する食品成分として、benzyl isothiocyanate (BITC) を同定した。BITCはインスリン非依存的にphosphatidylinositol 3-kinase及びAktのリン酸化を誘導し、大腸がん細胞の生存経路、オートファジー、脂肪細胞のグルコース取込みを活性化することを見出した。また、膜マイクロドメイン修飾成分やPI3K阻害剤はBITCの抗がん作用を増強することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the physiological significance of the constitutive and structural changes of membrane microdomains by food chemicals through studies on their modulation of insulin signaling activation and its consequent phenomena such as the cancer cell survival and lipid accumulation. We identified benzyl isothiocyanate (BITC) as an insulin signal modulator. BITC enhanced glucose uptake in adipocytes as well as the survival pathway and autophagy in colorectal cancer cells, possibly through the activation of insulin signaling. The anti-cancer effect of BITC was potentiated by insulin signaling inhibitors as well as methyl-cyclodextrin, a depleting agent of membrane cholesterol.

研究分野：機能性食品成分のケミカルバイオロジー(化学に基づいた生物学的研究)

キーワード：食品 生体分子 分析化学 生化学 膜マイクロドメイン インスリン イソチオシアネート

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜には、グリセリン脂質で占められた流動性の高い領域以外に、膜タンパク質に加えて、スフィンゴ脂質とコレステロールを主要構成成分としたナノメートルスケールの微小領域、膜マイクロドメインが存在する。

生体膜マイクロドメインは、その立体構造と構成要素から、flotillin を含む脂質ラフトと caveolin を含むカベオラに分類されるが、これらは脂質アンカー型膜タンパク質のアンカー (2本の飽和アシル鎖) と安定に会合できることから、受容体をはじめとした様々なシグナル伝達分子を含有し、シグナル伝達や膜輸送において重要な中継点を形成している。脂質ラフトには G タンパク質や Src チロシンキナーゼ、カベオラには caveolin を足場とする Ras / MEK / ERK の存在が証明されているが、これらのシグナル伝達が活性酸素などによる膜マイクロドメインの修飾によって調節されている可能性が近年指摘されている。例えば、繊維芽細胞への過酸化水素処理は caveolin-1 の発現を増加し、ERK 依存的な細胞増殖を抑制することで老化を引き起こす。

一方、植物性食品成分が上記のシグナル伝達に影響を与え、炎症や細胞増殖などの様々な表現型を調節することは知られているものの、植物性食品成分の膜マイクロドメインへの影響は一部の報告を除いてほとんど理解されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物性食品成分が膜マイクロドメイン要素である脂質及び膜タンパク質の組成や機能に直接影響を与えるか否かを調査し、脂肪細胞の分化やがん細胞の増殖に重要なインスリンシグナル伝達における本ドメインの意義を明らかにすることを目的とした。

具体的には、(1) インスリンシグナル伝達を修飾する食品成分の探索と同定、(2) インスリンシグナル伝達修飾成分の細胞増殖や脂肪蓄積への影響の調査、(3) 膜マイクロドメイン構成要素の組成変化を誘導する methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) のインスリンシグナルへの影響の調査を行い、(4) これらの研究を通して、膜マイクロドメインを食品成分の重要な標的領域であることを確かなものにし、機能性食品開発における新たな指針を提案しようとした。

## 3. 研究の方法

膜マイクロドメインの分画は iodixanol 密度勾配遠心分離法を用い、有機溶媒抽出 (脂質) 画分の TLC 分析によるコレステロール検出により膜マイクロドメイン成分変化を確認した。脂肪細胞モデル 3T3-L1 細胞は、分

化誘導剤カクテル (isobutyl-methylxanthine、dexamethasone、insulin) を加えた DMEM 培地で培養し、成熟脂肪細胞への分化をオイルレッド O 染色により評価した。大腸がんモデル HCT-116 細胞での細胞生存、アポトーシス誘導、オートファジー誘導に対する食品成分の作用は、各種性化学実験手法を用いて評価した。脂肪細胞モデルや大腸がんモデルで、インスリンシグナル伝達に対する影響を各シグナル分子のリン酸化の western blotting にて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) インスリンシグナル伝達を修飾する食品成分とその生理作用

インスリンシグナル伝達を修飾する食品成分として、アブラナ科野菜に由来する benzyl isothiocyanate (BITC) を同定し、BITC がインスリン非依存的に phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 及び Akt のリン酸化を誘導し、大腸がん細胞の生存経路を活性化することを見出した。また、BITC はインスリン依存的なインスリン受容体、PI3K、Akt、FoxO1 のリン酸化を亢進した。(論文 2)

PI3K 阻害剤は BITC の細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用を増強するだけでなく、オートファジー関連分子の活性化や p62 依存的な Nrf2 活性化を抑制した。PI3K 阻害剤は BITC が誘導する薬剤耐性機構を阻害することで、BITC の抗がん作用を増強することが示唆された。(論文 2,5)

BITC は、脂肪細胞においてもインスリン誘導性の phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 及び Akt のリン酸化を増強し、脂肪細胞のグルコース取込みや脂肪蓄積を増加させることを見出した。(投稿中)

BITC はアセトアルデヒド代謝に関わる aldehyde dehydrogenase 遺伝子発現を誘導し、アルコール毒性に対して保護的に機能する可能性を見出した。ケルセチン配糖体体内代謝物にも過酸化水素やアセトアルデヒドに対する抵抗性を賦与する効果が認められた。(論文 1,3,4)

### (3) 膜マイクロドメイン構成要素の組成変のインスリンシグナルへの影響

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) を処理した大腸がん細胞を用いて、密度勾配遠心分離法による膜マイクロドメインの分画、脂質画分の TLC 分析により、膜マイクロドメインからのコレステロール低下作用を確認するところで、膜マイクロドメイン脂質組成分析法を確立した。

M $\beta$ CD は、BITC が誘導する Akt のリン酸化を、膜マイクロドメインのコレステロール低下作用を介して抑制され、この作用はコレステロールの添加により解除されることを明らかにした。さらに、M $\beta$ CD は BITC の細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用を増強することを見出した。(投稿中)

以上の研究を通して、膜マイクロドメインはインスリンシグナル伝達を調節する重要な標的領域であり、食品成分により調節が可能であることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

主なもの(すべて査読あり)

1. Nakamura, T., Abe-Kanoh, N., Nakamura, Y. Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **62**, 11-19 (2018). Review  
doi: 10.3164/jcfn.17-91.
2. Liu, X., Abe-Kanoh, N., Liu, Y., Zhu, B., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase impairs the benzyl isothiocyanate-induced accumulation of autophagic molecules and Nrf2 in human colon cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 2212-2215 (2017).  
doi: 10.1080/09168451.2017.1374830.
3. Liu, Y., Kurita, A., Nakashima, S., Zhu, B., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a potential aldehyde dehydrogenase inducer in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1978-1983 (2017).  
doi: 10.1080/09168451.2017.1361809.
4. Liu, Y., Yamanaka, M., Abe-Kanoh, N., Liu, X., Zhu, B., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. Benzyl isothiocyanate ameliorates acetaldehyde-induced cytotoxicity by enhancing aldehyde dehydrogenase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. *Food Chem. Toxicol.*, **108**, 305-313 (2017).  
doi: 10.1016/j.fct.2017.08.016.
5. Liu, X., Takano, C., Shimizu, T., Yokobe, S., Abe-Kanoh, N., Zhu, B., Nakamura, T., Munemasa, S., Murata, Y., Nakamura, Y. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase ameliorates antiproliferation by benzyl isothiocyanate in human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**, 209-216 (2017).  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.078.
6. Tang, Y., Nakashima, S., Saiki, S., Myoi, Y., Abe, N., Kuwazuru, S., Zhu, B., Ashida, H., Murata, Y., Nakamura, Y. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. *Food Res Int.*, **89**, 716-723 (2016).  
doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.034.

〔学会発表〕(計9件)

1. Yang Qifu, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin potentiated BITC-induced anti-cancer effect through modulation of the survival pathway in human colorectal cancer cells, 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会, 広島大学(西条・広島), 2018/1/27.
2. 佐々木郁実, Liang Ying, 竹田有希, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督. ベンジルイソチオシアネートの脂肪蓄積抑制作用とその分子機構, 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会, 広島大学(西条・広島), 2018/1/27.
3. Liang Ying, 佐々木郁実, 竹田有希, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督. Benzyl isothiocyanate enhances glucose uptake and lipid accumulation via PI3K/Akt signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes, 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会, 広島大学(西条・広島), 2018/1/27.
4. Liu, X., Abe-Kanoh, N., Liu, Y., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. A link between benzyl isothiocyanate-induced autophagy and Nrf2/Keap1 regulation in human colon cancer cells, 日本農芸化学会2017年度関西・中四国・西日本支部合同大会, 大阪府立大学(堺・大阪), 2017/9/22.
5. Nakamura, Y. Phenolic acid catabolites are predominant biologically active compounds derived from quercetin glycosides, 8th International Conference on polyphenols and Health (招待講演), Quebec (Canada), 2017/10/04.
6. 中村宜督. フラボノイド配糖体代謝物の生体防御賦活作用, 日本農芸化学会中四国支部第48回講演会(例会)シンポジウム「生物資源を活用した応用研究」(招待講演), 徳島大学(徳島), 2017/6/17.
7. 中村宜督. イソチオシアネートの大腸がん細胞増殖抑制作用とその分子標的, 第13回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム(招待講演), 奈良女子大学(奈良), 2017/3/16.
8. Liu, X., Takano, C., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway plays a negative role in anti-proliferative effect of benzyl isothiocyanate. 日本農芸化学会中四国支部第47回講演会, 島根大学(島根・松江), 2017/1/28.
9. Nakamura, Y., Naomi Abe, Identification of Novel Targets for Antiproliferation by Benzyl Isothiocyanate in Colorectal Cancer Cells. International and 29th annual meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (招待講演), 2016/11/9., Kobe Convention Center (Kobe).

〔図書〕(計1件)

1. 中村宜督, 中山書店, 食べ物と健康 1.  
食品学総論 食品の成分と機能 2 章食  
品の機能 1-3 脂質, 2018, 45-55.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://yossan24okayama.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 宜督 (NAKAMURA, Yoshimasa)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授  
研究者番号: 60324381

(2) 研究分担者

加藤 陽二 (KATO, Yoji)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授  
研究者番号: 30305693

中村 俊之 (NAKAMURA, Toshiyuki)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教  
研究者番号: 90706988

(3) 研究協力者

Liu Xiaoyang (LIU, Xiaoyang)

Yang Qifu (YANG, Qifu)

Liang Ying (LIANG, Ying)

佐々木 郁実 (SASAKI, Ikumi)